

DEPARTAMENT DE GENÈTICA

FACULTAT DE BIOLOGIA



UNIVERSITAT DE BARCELONA



ANÀLISI DE MUTACIONS I EXPRESSIÓ D'AL·LELS MUTATS A LA MALALTIA DE GAUCHER I LA SÍNDROME DE SANFILIPPO TIPUS A

Magda Montfort Roca

2004

ANÀLISI DE MUTACIONS I EXPRESSIÓ D'AL·LELS MUTATS A LA MALALTIA DE GAUCHER I LA SÍNDROME DE SANFILIPPO TIPUS A

Memòria presentada per

Magda Montfort Roca

Per optar al grau de

Doctora en Ciències Biològiques

*Tesi cursada sota la direcció de la Dra. Lluïsa
Vilageliu Arqués
i el Dr. Daniel Grinberg Vaisman
al Departament de Genètica de la Facultat de
Biologia
Universitat de Barcelona
Programa de Genètica (Bienni 1997-1999)*

Lluïsa Vilageliu

Daniel Grinberg

Magda Montfort

Barcelona, maig de 2004

*Al David i
a la meva família*

INDEX

ABREVIATURES	11
INTRODUCCIÓ	13
MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA.....	15
MUCOPOLISACARIDOSI IIIA	21
1- INTRODUCCIÓ	23
2- CLÍNICA.....	24
3- DIAGNÒSTIC	25
3.1- DIAGNÒSTIC DIFERENCIAL	25
3.2- DIAGNÒSTIC ENZIMÀTIC.....	26
3.3- DIAGNÒSTIC MOLECULAR.....	27
4- BIOQUÍMICA	27
4.1- L'ENZIM: SGHS	27
4.1.1- CENTRE ACTIU	28
4.1.2- COMPARACIONS DE SEQUÈNCIA	
INTERESPECÍFIQUES	29
4.1.3- SÍNTESI I DEGRADACIÓ.....	31
4.2- EL SUBSTRAT.....	32
4.3- MECANISME CATALÍTIC	33
5- GENÈTICA.....	34
5.1- EL GEN: <i>SGSH</i>	34
5.1.1- MAPATGE.....	34
5.1.2- ESTRUCTURA, ORGANITZACIÓ I EXPRESSIÓ	34
5.1.3- POLIMORFISMES	36
5.2- MUTACIONS	36
6- PREVENCIÓ GENÈTICA	39
6.1- DIAGNÒSTIC PRENATAL.....	39
6.2- CONSELL GENÈTIC.....	39
7- CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP.....	39
8- EXPRESSIÓ D'AL·LELS MUTANTS	40
9- MODELS ANIMALS	42
10- TERÀPIA.....	42
10.1- TERÀPIA DE SUPORT.....	42
10.2- TRASPLANTAMENTS DE MEDUL·LA ÒSSIA	43

10.3- REEMPLAÇAMENT ENZIMÀTIC	43
10.4- TRANSFERÈNCIA GÈNICA	43
MALALTIA DE GAUCHER	45
1- INTRODUCCIÓ	47
2- CLÍNICA.....	47
2.1- MANIFESTACIONS CLÍNIQUES	47
2.2- TIPUS CLÍNICS	50
2.2.1- TIPUS I: NO NEURONOPÀTIC	50
2.2.2- TIPUS II: NEURONOPÀTIC AGUT	51
2.2.3- TIPUS III: NEURONOPÀTIC SUBAGUT	52
3- DIAGNÒSTIC.....	52
3.1- DIAGNÒSTIC MORFOLÒGIC	52
3.2- DIAGNÒSTIC ENZIMÀTIC	53
3.3- DIAGNÒSTIC MOLECULAR.....	54
4- BIOQUÍMICA.....	54
4.1- L'ENZIM: GBA	55
4.1.1- ESTRUCTURA I CENTRE ACTIU	56
4.1.2- COMPARACIONS DE SEQÜÈNCIA INTERESPECÍFIQUES.....	57
4.1.3- SÍNTESI I PROCESSAMENT.....	58
4.2- EL SUBSTRAT.....	59
4.3- MECANISME CATALÍTIC	60
5- GENÈTICA	61
5.1- EL GEN <i>GBA</i>	61
5.1.1- ESTRUCTURA: GEN-PSEUDOGÈN.....	61
5.1.2- MAPATGE.....	62
5.1.3- POLIMORFISMES	63
5.1.4- ESTRUCTURA, ORGANITZACIÓ I EXPRESSIÓ	64
5.2- EL GEN DE LA PROSAPOSINA	64
5.3- MUTACIONS EN EL GEN <i>GBA</i>	65
5.3.1- PREVALENÇA.....	65
5.3.2- DATACIÓ: MUTACIÓ N370S.....	66
5.3.3- AL·LELS RECOMBINANTS	66
5.3.4- CODONS D'ATURADA PREMATURA I PROCÉS DE NMD	67

5.4- MUTACIONS EN EL GEN PSAP RESPONSABLES DE LA MALALTIA DE GAUCHER.....	68
6- PREVENCIÓ GENÈTICA	69
6.1- DIAGNÒSTIC PRENATAL.....	69
6.2- CONSELL GENÈTIC	69
7- CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP.....	70
7.1- TIPUS I	70
7.2- AFECTACIÓ NEUROLÒGICA.....	71
7.3- FORMA LETAL PERINATAL	71
7.4- FORMA ATÍPICA AMB IMPLICACIÓ CARDIOVASCULAR	72
8- EXPRESSIÓ D'AL·LELS MUTANTS	72
9- MODELS ANIMALS	74
10- TERÀPIA.....	75
10.1- TERÀPIA DE SUPORT.....	75
10.2- REEMPLAÇAMENT ENZIMÀTIC.....	76
10.3- TERÀPIA DE REDUCCIÓ DE SUBSTRAT.....	77
10.4- TRASPLANTAMENTS DE MEDULLA ÒSSIA	78
10.5 - TRANSFERÈNCIA GÈNICA	78
OBJECTIUS	81
RESULTATS	85
MUCOPOLISACARIDOSI IIIA	87
CAPÍTOL 1:	89
<i>Primera anàlisi de mutacions en 11 pacients espanyols: elevada prevalença de la mutació c.1079delC</i>	
CAPÍTOL 2:	97
<i>Anàlisi de mutacions i estudi d'haplotips en 26 pacients afectats per la mucopolisacaridosi IIIA: possible origen únic de la mutació c.1079delC</i>	
CAPÍTOL 3:	105
<i>Diagnòstic prenatal i de portadors de familiars de pacients afectes per la mucopolisacaridosi IIIA</i>	
CAPÍTOL 4:	111
<i>Expressió i caracterització funcional de mutacions responsables de la mucopolisacaridosi IIIA en cèl·lules d'insecte</i>	

MALALTIA DE GAUCHER	131
CAPÍTOL 5:	133
<i>Expressió i caracterització funcional de diferents mutacions responsables de la malaltia de Gaucher en cèl·lules d'insecte</i>	
CAPÍTOL 6:	145
<i>Anàlisi de la disminució dels nivells de transcrits portadors de mutacions que donen lloc a senyals d'aturada prematura en el gen de la β-glucosidasa àcida</i>	
DISCUSSIÓ	161
 MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA.....	163
IMPORTÀNCIA DE L'ESTUDI DE LES MALATIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA.....	165
 MUCOPOLISACARIDOSI IIIA	167
1- ANÀLISI MUTACIONAL	169
2- DIAGNÒSTIC MOLECULAR.....	181
3- EXPRESSIÓ D'AL·LELS MUTATS	182
4- CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP	188
 MALALTIA DE GAUCHER	191
1- EXPRESSIÓ D'AL·LELS MUTATS	193
2- NMD.....	200
3- CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP	205
 CONCLUSIONS.....	211
 BIBLIOGRAFIA.....	217
 ANNEX.....	233

TAULES

INTRODUCCIÓ

Taula 1: Malalties d'acumulació lisosòmica.....	18
Taula 2: Enzims responsables de la síndrome de Sanfilippo A,B,C i D.....	23
Taula 3: Aminoàcids presents en el centre actiu de la sulfamidasa per comparació amb els predits per l'ARSB.....	30
Taula 4: Mutacions en el SGSH causants de la MPS IIIA.....	37
Taula 4: (continuació) Mutacions en el SGSH causants de la MPS IIIA.....	38
Taula 5: Descripció dels tres tipus clínics de la malaltia de Gaucher.....	50
Taula 6: Gens o seqüències homòlogues trobades en diversos organismes que codifiquen per la β -glucosidasa àcida.....	57
Taula 7: Mutacions responsables de la malaltia de Gaucher en el gen de la prosaposina.....	69
Taula 8: Mutacions expressades en diferents estudis sobre l'activitat de l'enzim GBA.....	73

DISCUSSIÓ

Taula 1: Freqüència de les mutacions S66W, R74C, R245H i 1079delC entre els pacients amb MPS IIIA en diferents regions geogràfiques.....	173
Taula 2: Associació entre mutacions i haplotips trobats en les mostres analitzades de la població espanyola.....	178
Taula 3: Freqüències al·lèliques dels polimorfismes IVS2-26T>C, IVS5+17C>T, IVS5- 37GC>CTGT i R456H G>A.....	178
Taula 4: Genotips dels pacients amb fenotips intermedi i lleu.....	189
Taula 5: Mostres, genotips, edat de diagnòstic i alguns trets clínics de pacients afectats de la malaltia de Gaucher.....	201

FIGURES

INTRODUCCIÓ

Figura 1: Pacients amb la mucopolisacaridosi IIIA	24
Figura 2: Cascada de degradació de l'heparà sulfat	28
Figura 3: Estructura de la sulfamidasa.	28
Figura 4: Alineament de la seqüència aminoacídica de la sulfamidasa humana, canina i murina...	29
Figura 5: Estructura tridimensional de la sulfamidasa canina predita a partir de l'estructura de l'ARSA i l'ARSB	30
Figura 5: (continuació) Estructura tridimensional de la sulfamidasa canina predita a partir de l'estructura de l'ARSA i l'ARSB	31
Figura 6: Mecanisme de transport dels enzims lisosòmics des del reticle endoplasmàtic fins als lisosomes	32
Figura 7: Estructura de l'heparà sulfat.	33
Figura 8: Polimorfismes presents en el gen de la sulfamidasa i estructura gènica	35
Figura 9: Nen amb la malaltia de Gaucher tipus I	48
Figura 10: Macròfag carregat de lípids o "cèl·lula de Gaucher"	53
Figura 11: Relació química i metabòlica entre els principals esfingolípid.	55
Figura 12: Estructura per raigs X de la β -glucosidasa àcida	56
Figura 13: Esquema de la biosíntesi de l'enzim β -glucosidasa àcida	58
Figura 14: Estructura del glucocerebròsid o glucosilceramida	59
Figura 15: Model per a la degradació de la glucosilceramida	60
Figura 16: Estructura del gen i el pseudogen de la β -glucosidasa àcida	61
Figura 17: Localització cromosòmica del gen responsable de la malaltia de Gaucher	63
Figura 18: Seqüència aminoacídica de la SAP-C i localització dels seus ponts d'hidrogen	65
Figura 19: Freqüències relatives de les mutacions responsables de la malaltia de Gaucher en la població espanyola	66
Figura 20: Entrecreuament recíproc entre regions homòlogues de gen i pseudogen (ψ) de la β -glucosidasa àcida	67
Figura 21: Model del procés de NMD	68
Figura 22: Pacient que presenta una important millora en la visceromegàlia després de sotmetre's a la teràpia de reemplaçament enzimàtic	77

RESULTATS

Figura 1: Detecció de la mutació c.1079delC per anàlisi de restricció amb l'enzim <i>TaiI</i>	120
Figura 2: Arbre genealògic de tres famílies amb fills afectes per la MPS IIIA	120

DISCUSSIÓ

Figura 1: Condicions emprades per a l'anàlisi de les cadenes senzilles en gels de poliacrilamida	169
Figura 2: Patrons d'SSCP de l'exó 2 dels pacients SFA-10 i SFA-9.....	170
Figura 3: Situació geogràfica de les mutacions més freqüents causants de la síndrome de Sanfilippo A en les diferents poblacions europees analitzades	175
Figura 4: Distribució de les mutacions causants de la MPS IIIA en la població espanyola	179
Figura 5: Número total de mutacions present en cadascun dels exons	180
Figura 6: Estructura tridimensional de la β -glucosidasa àcida. Localització dels residus mutats analitzats en el present treball.....	195
Figura 7: Localització dels residus Val394, Leu444 i Arg463.	199
Figura 8: Esquema de la PCR a temps real	202

ABREVIATURES

aa	aminoàcid
ARSA	Arilsulfatasa A
ARSB	Arilsulfatasa B
Cèl·lules ES	Cèl·lules soca embrionàries
CNS	Sistema nerviós central
Col.	Col·laboradors
CRIM	<i>Cross-reacting immunological material</i>
GBA	Gen que codifica per la proteïna β -glucosidasa àcida
GBA	β -glucosidasa àcida
G-CSF	Factor d'estimulació de granulòcits de colònies
h	Hora
HS	Heparà sulfat
kDa	Kilodalton
LSD	Malaltia d'acumulació lisosòmica
M6P	Manosa-6-fosfat
MGB	<i>Minor groove binder</i>
MPS	Mucopolisacaridosi
NMD	Degradació de l'mRNA degut a la presència d'un codó sense sentit (<i>nonsense mediated mRNA-decay</i>)
NS	Heparà N-sulfatasa
PSAP	Gen que codifica per la proteïna activadora d'esfingolípids
PSAP	Precursor de la proteïna activadora d'esfingolípids
PTC	Codó de terminació prematura
rhNS	Sulfamidasa humana recombinant
SAP	Proteïna activadora d'esfingolípids
SGSH	Gen que codifica per la proteïna N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa (sulfamidasa)
SGSH	N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa (sulfamidasa)
SNC	Sistema nerviós central
SSCP	Polimorfisme en la conformació de les cadenes senzilles (<i>single strand conformation polymorphism</i>)
TRE	Teràpia de reemplaçament enzimàtic

INTRODUCCIÓ

***MALALTIES
D'ACUMULACIÓ
LISOSÒMICA***

MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA

Les malalties d'acumulació lisosòmica estan causades per disfunció del sistema lisosòmic. Els primers estudis d'aquests tipus de malalties daten de finals del segle XIX i, algunes de les substàncies implicades van ser identificades en la primera meitat del segle XX. Els lisosomes van ser descoberts al 1955 (De Duve i col., 1955) i el concepte de malaltia d'acumulació lisosòmica s'originà al 1963 (Hers, 1963), amb el descobriment de que la glicogenosi tipus II (malaltia de Pompe) estava causada pel defecte en un enzim present normalment en els lisosomes i que el glicogen acumulat, presumiblement derivava del sistema lisosòmic.

Els lisosomes són vesícules intracel·lulars en les quals les (macro)molècules són degradades fins a components de baix pes molecular. La degradació lisosòmica està catalitzada per enzims que treballen sovint en coordinació per reduir (glico)proteïnes, (glico)lípid, glicosaminoglicans i un gran nombre de components, des de lipoproteïnes de baixa densitat (LDLs) fins a estructures monomèriques (aminoàcids, monosacàrids, etc.).

Les malalties d'acumulació lisosòmica comprenen un grup heterogeni de més de quaranta malalties diferents (taula 1). La característica comuna de totes elles és la

deficiència en alguna proteïna lisosòmica que forma part d'un pas catalític. Aquestes proteïnes poden ser hidrolases o cofactors generalment involucrats en la degradació de macromolècules o transportadors, que lliberen els productes al citosol. Com a resultat d'aquesta acumulació els lisosomes augmenten tant en nombre com en mida fet que pot afectar la fisiologia cel·lular.

Presenten una herència autosòmica recessiva, amb algunes excepcions com en el cas de les malalties de Fabry i Hunter, que estan lligades al cromosoma X.

Molts dels pacients que hereten alguna d'aquestes malalties no presenten símptomes en el moment del naixement però poden presentar un elevat rang de manifestacions clíniques durant els primers anys de vida. Aquestes manifestacions clíniques depenen de la malaltia concreta que presenta cada pacient, tot i que alguns dels símptomes són més freqüents que altres. Aquest seria el cas de l'afectació en el sistema nerviós central (CNS), present en major o menor grau, en la majoria de pacients amb malalties d'acumulació lisosòmica. També són freqüents els problemes esquelètics i l'organomegàlia, entre altres (Neufeld i Muenzer, 1995).